

審査の結果の要旨

肥 後 剛 康

IP₃Rs の活性は ER の微小環境に強く影響されていることが示唆されていたが、その分子機構は不明であり、細胞内カルシウムシグナルを理解する上で大きな障害となっている。本研究では、ER における微小環境の変化と、それによるカルシウム動態の制御機構という概念の分子レベルでの具現化を目指し、下記の結果を得ている。

1. 3種のサブタイプがある IP₃Rs の ER 内腔ドメインでサブタイプ間の相同性が低い領域(L3V)に結合するタンパク質を検索し、ERp44 を見いだした。ERp44 はレドックス制御タンパク質であるチオレドキシシンと相同性を有する ER 内腔タンパク質であった。In vitro の結合実験より、ERp44 は IP₃R type2(IP₃R2), type3(IP₃R3)ではなく type1(IP₃R1)に特異的に結合し、その結合は、pH, カルシウム濃度、そして両タンパク質のレドックス状態に依存することが示された。
2. カルシウムイメージング実験によって ERp44 の in vivo における IP₃R1 活性への影響を調べた。ERp44 を過剰発現している細胞を可視化するため、赤色蛍光タンパク質(RFP)を融合した ERp44(RFP-ERp44)を細胞に発現させ、アゴニスト刺激を行い、IP₃R を介したカルシウム放出(IICR)を測定した。ERp44 の過剰発現は、HeLa 細胞(IP₃R1 の発現が IP₃R2, 3 より優勢)、DT40-KMN60 細胞(IP₃R1 のみ発現する)で IICR を抑制、一方 COS-7 細胞(IP₃R1 の発現が極めて低い)、DT40-1KO 細胞の IICR には影響を与えなかった。
3. RNAi によって ERp44 をノックダウンしたところ HeLa 細胞では IICR が増強したが、COS-7 細胞では IICR に変化は見られなかった。これらの結果より ERp44 が IP₃R2, 3 ではなく IP₃R1 を特異的に抑制することが示された。
4. ERp44 のどの領域が IP₃R1 の抑制に重要かを調べた。まず、ERp44 の 236-345 番目のアミノ酸が IP₃R1 binding domain (IPBD) であることを見いだした。しかし IPBD は全長 ERp44 ほど IP₃R1 を抑制しなかった。この結果より IP₃R1 の

抑制には ERp44 の IP₃R1 への結合領域だけでなくその他の領域も必要であることが示された。

5. IP₃R1-ERp44 の相互作用における IP₃R1 のシステイン残基の重要性を調べた。COS-7 細胞に発現させた IP₃R1 のシステイン変異体と ERp44 の結合は顕著に低下した。その生理的意義を調べるため、DT40-TKO に IP₃R1 のシステイン変異体と RFP-ERp44 を発現、IgM 抗体で刺激したところ IICR の抑制は観察されなかった。この結果により IP₃R1 のシステイン残基が ERp44 による IP₃R1 活性の抑制に必須であることが示された。

6. 人工脂質二重膜を用いて単一チャンネルレベルの IP₃R1 活性の測定を行った。ER 内腔側が還元状態(DTT 存在下)、低カルシウム濃度で ERp44 の ER 内腔側への添加は IP₃R1 を不活性化した。

以上、本論文は IP₃R を ER 内腔から、レドックス状態とカルシウム濃度に依存して制御するタンパク質の存在を明らかにした。この発見は、IP₃R のみならずカルシウムシグナリング制御機構における大きなブレイクスルーであり、カルシウムによって引き起こされる多様な生物応答の解明に重要な貢献を成すと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。